

生物破乳菌形态、表面性质和物质特征研究方法与进展

黄翔峰 殷万 彭开铭 陆丽君 刘佳*

(同济大学环境科学与工程学院 污染控制与资源化研究国家重点实验室 上海 200092)

摘要: 生物破乳菌在石油开采与加工行业的研究已经引起各界的广泛关注,然而由于生物破乳菌菌体形态、表面性质和表面物质的复杂性,使菌体的破乳活性特征尚未被揭示。本文介绍了生物破乳剂的来源、合成及破乳机制;归纳了影响生物破乳菌破乳活性的菌体形态、表面性质和表面物质三方面因素的研究进展,特别是总结了相关研究的方法;最后在此基础上对今后研究方向提出展望。

关键词: 生物破乳菌, 破乳, 菌体形态, 表面性质, 表面物质

Research methods and progress of mycelial morphology, surface properties and surface substances affecting demulsifying activity of biological demulsifying bacteria

HUANG Xiang-Feng YIN Wan PENG Kai-Ming LU Li-Jun LIU Jia*

(College of Environmental Science and Engineering, State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: The researches on biological demulsifying bacteria have aroused widespread interests in oil exploitation and refining industry. However, the characteristics of demulsifying activities of biological demulsifying bacteria were not revealed owing to its complexity of mycelial morphology, surface properties and surface substances. In this paper, the classification, biosynthesis and demulsification mechanism of biodemulsifiers were introduced, and then the research progresses were reviewed focusing on the influence of mycelial morphology, surface properties and surface substances on the demulsifying activity. The research methods concerned in this field were specially focused. Based on the above analysis, the future research directions were proposed.

Keywords: Biological demulsifying bacteria, Demulsification, Mycelial morphology, Surface properties, Surface substances

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 51108333); 国家水体污染控制与治理科技重大专项项目(No. 2012ZX07101006); 教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-10-0629)

*通讯作者: Tel: 86-21-65985792; 信箱: liujia@tongji.edu.cn

收稿日期: 2014-09-09; 接受日期: 2014-11-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-01-22

原油在开采过程中有近 80%以原油乳状液的形式存在,且大多是油包水(W/O)型^[1],原油乳状液的破乳对原油开采、运输及加工十分重要^[2]。目前大多数油田对原油乳状液进行破乳主要是添加化学破乳剂,但其具有选择性强、投加量大、难生物降解等缺点^[3]。与化学破乳剂相比,生物破乳剂具有应用范围广、易于降解、对环境污染小并能通过发酵生产等优点,受到了国内外研究者的普遍重视^[4-6]。生物破乳剂是微生物代谢产生的,能使油水分离的生物制剂,包括微生物代谢产生的具有两亲性质的胞外产物和具有特殊表面性质和物质的生物破乳菌。其中,生物破乳菌表面复杂的结构、丰富的官能团和物质使得其具有更为高效的破乳性能和更好的适应性,因而受到更多研究者的关注,

但这也是生物破乳剂研究的重点和难点。

经过三十几年的研究发展,生物破乳菌的筛选鉴定、培养优化以及破乳效果的表征研究取得了一定的进展。在此基础上,生物破乳菌破乳活性的影响因素研究成为一大热点。本文系统地归纳和阐述了影响生物破乳菌破乳活性的菌体形态、表面性质和破乳活性物质,有助于指导破乳活性物质的合成和阐释生物破乳机理。

1 生物破乳剂的来源、合成及破乳机制

目前国内外研究发现的生物破乳剂种类丰富,包括不同菌种的生物破乳菌和多种胞外产物。由表 1 可知,生物破乳菌来源广泛,多来源于受石油污染的土壤、海水、海泥、活性污泥等环境样品^[7-8];在种群方面,属主要包括 *Dietzia*、*Rhodococcus*、

表 1 生物破乳剂的分类及破乳活性
Table 1 Classification and demulsifying activity of biodemulsifier

类别 Category	菌株 Strain	微生物来源 Source of bacteria	破乳活性 Demulsifying activity		参考文献 Reference
			乳状液 Emulsion	破乳率 Demulsification ratio (%)	
生物破乳菌 Biological demulsifying bacteria	<i>Ochrobactrum anthropi</i> strain RIP15-1	受石油污染的沙岸	ME (W/O/W)	72 (8.5 h)	[12]
	<i>Dietzia</i> sp. S-JS-1	受石油污染土壤	ME (W/O, O/W)	88.3, 76.4 (5 h)	[13]
	<i>Alcaligenes</i> sp. S-XJ-1	受石油污染土壤	ME (W/O, O/W)	96.5, 49.8 (24 h)	[14]
	<i>Rhodococcus</i> sp. PR-1	油田废水	ME (W/O)	100 (8 h)	[15]
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	受石油污染土壤	ME (W/O)	96 (24 h)	[16]
	<i>Acinetobacter radioresistans</i>				
	<i>Micrococcus</i> sp.	加油站土壤	ME (W/O, O/W)	($T_{1/2}$ =127.7, 10.2 h)	[17]
	<i>Nocardia amarae</i>	菌种库	ME (W/O)	($T_{1/2}$ =10.5 h)	[18]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MSJ	受石油污染土壤	ME (O/W, W/O)		[19]
胞外产物 Extracellular products	<i>Paenibacillus alvei</i> ARN63	油井	COE (W/O)	59 (48 h)	[20]
	<i>Bacillus mojavensis</i> XH1	受石油污染土壤	ME (O/W)	87.2 (24 h)	[21]
	<i>Streptomyces</i> sp.	海水、海泥	ME (O/W)	95 (24 h)	[7]
	<i>Bacillus subtilis</i>	菌种库	COE (O/W)	TOC 减少 51 (16 min)	[22]

注: ME: 模型乳状液; COE: 原油乳状液; TOC: 总有机碳; $T_{1/2}$: 半衰期。

Note: ME: Model emulsion; COE: Crude oil emulsion; TOC: Total organic carbon; $T_{1/2}$: Half-life.

Alcaligenes、*Nocardia*、*Pseudomonas*、*Acinetobacter* 等,生物破乳菌的系统发育树表明生物破乳菌主要分布于放线菌门、厚壁菌门、变形菌门^[9]。其中 *Mycobacteria*、*Nocardia*、*Corynebacteria* 菌体细胞壁外具有蜡质层形成的独特细胞被膜结构,主要是由长链脂肪酸和枝菌酸组成^[10-11]。

在生物破乳剂的合成研究中,为提高其产量和破乳活性,已开展了大量的培养基优化研究。培养基优化研究^[12,20-21,23-25]主要包括碳源、氮源、无机离子、生长因子、温度、pH、转速和接种量等。其中,碳源和 pH 的影响最大。碳源多采用疏水性碳源(烷烃^[17,25]和脂肪酸酯^[26]),也有采用亲水性碳源^[12,22]和复合碳源^[21]。但碳源的成本较高是生物破乳剂合成成本过高的一个主要原因,因此近年来有研究者开始关注以废弃油脂为碳源来合成生物破乳剂以降低合成成本^[25,27]。pH 与生物破乳剂的种类有关。黄翔峰等^[28]研究指出在初始 pH 为 10.0 条件下培养 *Alcaligenes* sp. S-XJ-1,其生物破乳剂产量最高。

生物破乳剂的破乳活性与乳状液的类型和生物破乳剂的种类有关。目前,公认的生物破乳剂破乳机理主要是润湿作用和顶替作用。生物破乳菌细胞表面具有活性使其在乳状液油水界面上占据一个平衡位置,在破乳过程中,如果非连续相的两个液滴在同一个细胞表面接触、润湿并铺展,则这两个液滴在到达平衡前就会在细胞表面上凝聚;胞外产物型破乳剂具有很好的表面活性,容易渗透到油水界面,插入到油水表面乳化剂的空隙或部分取代乳化剂从而降低界面膜的强度实现破乳^[29-31]。也有研究指出破乳菌表面的高疏水性和界面活性使其容易吸附到油水界面取代乳化剂,降低界面膜强度使其失稳,从而导致非连续相液滴聚结实现破乳^[32]。如表 1 所示,生物破乳菌和胞外产物在破乳过程中呈现不同的破乳特征。生物破乳菌对 W/O 型乳状液的破乳率较高,更适用于 W/O 型乳状液;而胞外产物型破乳剂对 O/W 型乳状液的破乳率较

高,更适用于 O/W 型乳状液。推测原因是生物破乳菌表面的高疏水性使其在 W/O 型乳状液的连续相油相中迁移运动加快,更快到达油水界面,有利于润湿和顶替作用从而表现出较好的破乳活性;胞外产物分子量小,在 O/W 型乳状液的连续相水相中迁移运动更快,更快到达油水界面,有利于顶替作用从而表现出较好的破乳活性。生物破乳剂破乳机理的研究还处在摸索阶段,可以引进微吸液管技术^[33]、原子力显微镜(AFM)^[33]和界面流变仪^[34]等用于破乳机理的深入研究。

在生物破乳菌破乳过程中,菌体形态、表面性质和破乳活性物质对破乳活性有一定的影响。研究初期,研究者们多从宏观的菌体形态入手研究其对破乳活性的影响规律及机理。

2 生物破乳菌的菌体形态

菌体细胞的形状、菌体细胞和乳状液分散相液滴的相对大小和菌体细胞的完整性都会影响破乳效果^[29]。一般生物破乳菌的菌体形态呈椭圆形^[35]或短杆状^[36],冯志强等^[35]认为椭圆形的外形是固体破乳剂的有利形状,有利于破乳,但其机理尚不明确,有待进一步研究;大小介于 0.3 μm –10.0 μm 之间^[37],油田乳状液中稳定乳状液分散相液滴直径一般大于 100 nm^[38]。有研究者发现生物破乳剂 HRB-4 的菌体细胞短轴约 0.2 μm ,长轴约 0.8 μm ,比一般粗乳状液的液滴尺寸(0.2 μm)要大许多,有利于分散相液滴在其表面润湿、铺展以及聚结,有利于破乳,因而具有较高的脱水率,且脱出污水较清^[37]。

多数研究结果还表明菌体细胞越完整,其破乳效能越好^[15,36]。黄翔峰等^[36]研究发现 *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 菌体细胞破碎程度与破乳率呈现负相关($R^2=0.88$);超声波破碎红球菌 PR-1 菌体细胞后,其破乳能力仅为完整菌体细胞的 33%^[15],推测原因是完整的菌体细胞可以通过吸附架桥作用加速液滴聚集并过程从而提高破乳率。但 Fernandes 等^[39]的研究表明 *Acinetobacter* sp. LBBMA LU3 菌体细胞的完整性对菌体的破乳活性没有影响。综上所述,

不同的生物破乳菌,其菌体细胞的完整性与其破乳活性的关系不同。

由上可知,生物破乳菌的菌体形态确实一定程度上影响其破乳活性。然而随着研究的深入,越来越多的研究表明生物破乳菌的表面性质对破乳活性也有一定的影响。

3 生物破乳菌的表面性质

菌体细胞表面的基本性质主要是带电性(Zeta 电位)和疏水性^[40-41],研究结果表明它们对破乳活性都有一定的影响。

3.1 带电性

Zeta 电位值表征分散在水中颗粒的带电性^[42],反映颗粒之间相互排斥或吸引力的强度^[43]。关于油珠 Zeta 电位对乳状液的稳定性影响研究较多^[44-46],而生物破乳菌细胞表面的 Zeta 电位对破乳性能的影响研究相对较少。生物破乳菌菌体细胞表面常带负电,Zeta 电位值一般在-30—50 mV 之间。有研究认为菌体表面所带电荷与乳状液分散相液滴所带电荷相反,且 Zeta 电位值绝对值越大,越有利于破乳^[40-41]。Ly 等^[40]研究发现 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LLD16 和 LLD18 在 pH 4.5 时分别对应的 Zeta 电位为-40 mV 和-16 mV,它们对以阳离子为乳化剂的乳状液都有破乳效果,观察到加入 LLD16 的乳状液分层效果较加入 LLD18 的更明显。以上研究表明,与乳状液液滴带电性相反的菌体细胞会促进分散相液滴的聚结和凝聚,且其 Zeta 电位绝对值越大,聚结和凝聚现象越明显。

3.2 疏水性

大多数研究认为菌体细胞表面疏水性是决定生物破乳菌破乳活性的最重要因素之一,而且菌体细胞表面疏水性越高,其对 W/O 型破乳效果越好,推测原因在于对于 W/O 型乳状液,菌体细胞表面疏水性越高,其在乳状液油相中的迁移运动越快,因而能够更快地转移到油水界面^[26,32]。Huang 等^[26]研究发现 *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 的菌体细胞表面疏水

性与对 W/O 型乳状液的破乳率呈线性正相关,且 $R^2=0.88$; 马挺等^[15]利用具有很强疏水性的 *Rhodococcus* sp. PR-1 进行破乳,其培养液对 W/O 型模型乳状液的破乳率高达 100%,其后研究用正十六烷萃取菌体细胞表面的疏水性物质后,其破乳能力仅为完整菌体细胞的 52%。但 Fernandes 等^[39]对 *Acinetobacter* sp. LBBMA LU3 的研究发现菌体细胞表面疏水性不是决定其对 W/O 型乳状液破乳活性的重要因素。上述研究表明,菌体细胞表面疏水性与破乳活性的关系受菌种类型、培养条件和乳状液等因素的影响。

大多数生物破乳菌的菌体表面疏水性对其破乳活性至关重要,因此可以对其进行调控来提高疏水性。主要的调控手段是改变碳源和 pH, Huang 等^[26]以不同的植物油为碳源研究发现以葵花籽油为碳源培养其疏水性最高;黄翔峰等^[28]研究发现在初始 pH 为 10.0 条件下培养 *Alcaligenes* sp. S-XJ-1,其菌体细胞表面疏水性最高。碳源影响菌体细胞表面物质构成,从而影响细胞表面疏水性;pH 影响疏水性的机理尚不明确,有待进一步研究。

4 生物破乳菌的破乳活性物质

生物破乳菌表面物质的组成决定其表面性质,因此有必要从生物破乳菌的表面物质入手考察表面物质对表面性质甚至是破乳活性的影响。大多研究表明生物破乳菌在代谢过程中会产生破乳活性物质,破乳活性物质在破乳过程中起关键作用^[15,47],因而对其进行提取与鉴定有助于揭示破乳机理和调控破乳活性物质的合成。

4.1 生物破乳菌破乳活性物质的提取与鉴定

由于破乳活性物质类型尚不明确,所以从生物破乳菌表面提取破乳活性物质是比较困难的。目前研究者多借助胞外产物的提取方法,如表 2 所示,胞外产物的提取方法主要采用有机溶剂萃取法。常用的萃取剂有氯仿^[19-20]、甲苯^[22]、甲醇^[19-20]、乙醇^[21]等极性有机溶剂,这些溶剂可以单独使用,也

可以混合使用。对生物破乳菌表面破乳活性物质的提取,研究者首先从化学试剂提取破乳活性物质后菌体对破乳活性的影响入手。Huang 等^[14]用氯仿乙醇淋洗 *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 使其破乳活性几乎完全丧失,认为氯仿乙醇可以提取破乳活性物质,但并未验证淋洗物的破乳活性;其后续研究发现用二氯甲烷-蒸馏水能从 *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 表面洗脱出破乳活性物质,但残余菌体仍有较高活性,提取

并不完全^[39];最后发现用二氯甲烷和碱能充分提取破乳活性物质^[38]。

由于生物破乳菌表面破乳活性物质的提取困难,其相应的鉴定研究较少。研究者多借鉴胞外产物的鉴定方法,由表 2 可知,鉴定方法主要有色谱法、光谱法、质谱法等。对生物破乳菌表面破乳活性物质的鉴定,研究者首先从较为简单的定性方法入手,逐渐进行定量深入分析。Huang 等^[47]利用 TLC

表 2 生物破乳剂破乳活性物质的提取鉴定								
Table 2 Extraction and identification of demulsifying active substances of biodemulsifier								
类别 Category	生物破乳剂 Biodemulsifier	菌株 Strain	提取范围 Extraction range	提取方法 Extraction method	纯化方法 Purification method	鉴定方法 Identification method	破乳活性物质 Demulsifying active substances	参考文献 Reference
异位鉴定 Heterotopic identification	胞外产物	<i>Paenibacillus alvei</i> ARN63	无菌培养液	氯仿-甲醇溶液(2:1, 体积比)	蒸发有机溶剂	TLC、FT-IR	脂肽	[20]
		<i>Bacillus mojavensis</i> XH1	无菌培养液	乙醇	柱层析	TLC、UV-vis	蛋白质 脂肽	[21]
		<i>Streptomyces</i> sp.	孢子悬浮液		过滤离心		气生孢子	[7]
		<i>Bacillus subtilis</i>	无菌培养液	甲苯溶液	蒸发甲苯溶液	GLC、IR	乙偶姻	[22]
			鼠李糖脂溶液				鼠李糖脂	[48]
	生物破乳菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MSJ	上清液	HCl 溶液 氯仿-甲醇溶液(2:1, 体积比)	蒸发有机溶剂	GC-MS	脂肪酸 单糖	[19]
		<i>Alcaligenes</i> sp. S-XJ-1		二氯甲烷 NaOH 溶液	离心	TLC、FT-IR ESI-MS	碳水化合物 蛋白质, 脂质	[47]
				二氯甲烷 蒸馏水	硅胶柱层析	TLC、IR 氨基酸分析	肽类化合物	[49]
				氯仿-乙醇溶液(2:1, 体积比)	凝胶层析	TLC、FT-IR	脂肽	[14]
		<i>Rhodococcus</i> sp. PR-1	菌体细胞			GC-MS	枝菌酸	[15]
原位鉴定 In situ identification	生物破乳菌	<i>Alcaligenes</i> sp.S-XJ-1				IR、电位滴定 XPS MALDI-TOF-MS	低聚谷氨酸类	[50]

注: TLC: 薄层色谱; FT-IR: 傅里叶变换红外光谱; UV-vis: 紫外可见分光光度法; GLC: 气液色谱; IR: 红外光谱; GC-MS: 气相色谱-质谱联用法; ESI-MS: 电喷雾离子化质谱; XPS: X 射线光电子能谱; MALDI-TOF-MS: 基质辅助激光解析串联飞行时间质谱。

Note: TLC: Thin layer chromatography; FT-IR: Fourier transform infrared spectrometer; UV-vis: Ultraviolet-visible spectroscopy; GLC: Gas-liquid chromatography; IR: Infrared spectrum; GC-MS: Gas chromatography mass spectrometry; ESI-MS: Electrospray ionization mass spectrometry; XPS: X-ray photoelectron spectroscopy; MALDI-TOF-MS: Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry.

和 FT-IR 对从 *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 表面提取的破乳活性物质进行定性分析, 表明破乳活性物质包含氨基类物质和含糖类物质; 再利用比色法定量分析所含的大类物质组成, 结果显示破乳活性物质中含有碳水化合物 19.2%、蛋白 14.8%、以及脂类 11.3%; 同时利用 ESI-MS 鉴定破乳活性物质中分子离子峰的特征及分布, 表明提取的破乳活性物质以小分子物质为主。

菌体表面破乳活性物质的提取鉴定虽然借助胞外产物的研究方法和技术取得了一定进展, 但是还存在一定的弊端, 即提取的破乳活性物质的破乳活性较原始生物破乳菌低, 所以原位鉴定更为合适。

4.2 生物破乳菌破乳活性物质的原位鉴定

生物破乳菌破乳活性物质的原位鉴定可以克服提取鉴定存在的弊端, 所以原位鉴定是真实表征生物破乳菌表面破乳活性物质的重要步骤。近年来, 对微生物菌体细胞表面物质及官能团原位鉴定的技术主要有红外光谱^[51]、XPS^[52-53]、电位滴定^[54]、以及 MALDI-TOF-MS^[55]等。这些技术已被 Huang 等^[50]引入原位鉴定了不同碳源培养的具有不同破乳活性的 *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 表面的官能团及物质组成, 再结合化学计量学及统计学方法发现菌体表面含有相对丰富的蛋白和脂类有利于菌体破乳活性的发挥, 而多糖类物质则相反, 此外还发现低聚谷氨酸类物质为菌体表面破乳活性物质。

5 结论与建议

综上所述, 生物破乳菌的菌体形态、表面性质和破乳活性物质等都对破乳活性产生影响。其中关键因素是菌体细胞的表面性质主要是指疏水性, 基础是菌体细胞表面的破乳活性物质, 同时菌体的形态对破乳活性也有一定的影响。但是目前各个影响因素对破乳活性的影响机制研究及其影响因素之间的交互作用研究还不够完善。因此在定量描述影响因素与破乳活性的关系上, 探究多种影响因素下对生物破乳菌破乳活性的综合效应是一个值得继

续研究的方向。生物破乳菌破乳活性物质的成分复杂, 原位鉴定是其研究的重要方向。在今后的研究中, 可以引入原位鉴定技术手段如 XPS、MALDI-TOF-MS、电位滴定等来确定更多生物破乳菌的破乳活性物质。

参考文献

- [1] Yang XL, Lu WZ. Advances in stabilization and destabilization of water-in-crude oil emulsions[J]. Oilfield Chemistry, 1998, 15(1): 87-96 (in Chinese)
杨小莉, 陆婉珍. 有关原油乳状液稳定性的研究[J]. 油田化学, 1998, 15(1): 87-96
- [2] Mou JH. Research of crude oil demulsification mechanism and development of demulsifier[J]. Chemical Technology Market, 2002(4): 26-28,30 (in Chinese)
牟建海. 原油破乳机理研究与破乳剂的发展[J]. 化工科技市场, 2002(4): 26-28,30
- [3] Miao YX, Yi SJ. Review of environmental protective biodemulsifier[J]. Environmental Protection of Oil & Gas Fields, 2007, 17(4): 44-45,58 (in Chinese)
缪永霞, 易绍金. 环保型生物破乳剂的研究及应用[J]. 油气田环境保护, 2007, 17(4): 44-45,58
- [4] Amézcuca-Vega C, Poggi-Varaldo HM, Esparza-García F, et al. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(1): 237-240
- [5] Singh A, van Hamme JD, Ward OP. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. application aspects[J]. Biotechnology Advances, 2007, 25(1): 99-121
- [6] Jiang JL, Gou SQ, Da JW, et al. Recent advances in crude oil demulsification[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2009, 28(2): 214-221 (in Chinese)
姜佳丽, 苟社全, 达建文, 等. 原油破乳研究进展[J]. 化工进展, 2009, 28(2): 214-221
- [7] Park SH, Lee JH, Ko SH, et al. Demulsification of oil-in-water emulsions by aerial spores of a *Streptomyces* sp.[J]. Biotechnology Letters, 2000, 22(17): 1389-1395
- [8] Stewart AL, Gray NCC, Cairns WL, et al. Bacteria-induced de-emulsification of water-in-oil petroleum emulsions[J]. Biotechnology Letters, 1983, 5(11): 725-730
- [9] Huang XF, Guan W, Liu J, et al. Characterization and phylogenetic analysis of biodemulsifier-producing bacteria[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(1): 317-323
- [10] Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria[J]. Annual Review of Biochemistry, 1995, 64(1): 29-63
- [11] Naumann D. Encyclopedia of Analytical Chemistry: Infrared Spectroscopy in Microbiology[M]. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd, 2006: 8
- [12] Mohebbi G, Kaytash A, Etemadi N. Efficient breaking of water/oil emulsions by a newly isolated de-emulsifying bacterium, *Ochrobactrum anthropi* strain RIP15-1[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012, 98: 120-128
- [13] Liu J, Huang XF, Lu LJ, et al. Comparison between waste frying

- oil and paraffin as carbon source in the production of biodemulsifier by *Dietzia* sp. S-JS-1[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(24): 6481-6487
- [14] Huang XF, Liu J, Lu LJ, et al. Evaluation of screening methods for demulsifying bacteria and characterization of lipopeptide bio-demulsifier produced by *Alcaligenes* sp.[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(3): 1358-1365
- [15] Ma T, Liang FL, Xi YW, et al. Performance of demulsification by *Rhodococcus* sp. PR-1[J]. Environmental Science, 2006, 27(6): 1191-1196 (in Chinese)
马挺, 梁凤来, 奚艳伟, 等. 红球菌 PR-1菌株破乳性能研究[J]. 环境科学, 2006, 27(6): 1191-1196
- [16] Nadarajah N, Singh A, Ward OP. Evaluation of a mixed bacterial culture for de-emulsification of water-in-petroleum oil emulsions[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2002, 18(5): 435-440
- [17] Das M. Characterization of de-emulsification capabilities of a *Micrococcus* species[J]. Bioresource Technology, 2001, 79(1): 15-22
- [18] Cairns WL, Cooper DG, Zajic JE, et al. Characterization of *Nocardia amarae* as a potent biological coalescing agent of water-oil emulsions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 43(2): 362-366
- [19] Coutinho JO, Silva MP, Moraes PM, et al. Demulsifying properties of extracellular products and cells of *Pseudomonas aeruginosa* MSJ isolated from petroleum-contaminated soil[J]. Bioresource Technology, 2013, 128: 646-654
- [20] Amirabadi SS, Jahanmiri A, Rahimpour MR, et al. Investigation of *Paenibacillus alvei* ARN63 ability for biodemulsifier production: medium optimization to break heavy crude oil emulsion[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013, 109: 244-252
- [21] Li X, Li A, Liu C, et al. Characterization of the extracellular biodemulsifier of *Bacillus mojavensis* XH1 and the enhancement of demulsifying efficiency by optimization of the production medium composition[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(4): 626-634
- [22] Janiyani KL, Purohit HJ, Shanker R, et al. De-emulsification of oil-in-water emulsions by *Bacillus subtilis*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1994, 10(4): 452-456
- [23] Li X. Optimization of fermentation condition for biodemulsifier-producing bacterium and its regulation strategies[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Harbin Institute of Technology, 2012 (in Chinese)
李旭. 生物破乳剂产生菌发酵工艺条件优化及调控策略[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2012
- [24] Dai Y, Wei L, Wang JH, et al. Optimization of fermentation conditions for *Bacillus subtilis* and its demulsification efficiency[J]. Microbiology China, 2010, 37(4): 580-585 (in Chinese)
代阳, 魏利, 王继华, 等. 枯草芽孢杆菌发酵条件优化及其破乳效能[J]. 微生物学通报, 2010, 37(4): 580-585
- [25] Hou N, Feng FZ, Shi Y, et al. Characterization of the extracellular biodemulsifiers secreted by *Bacillus cereus* LH-6 and the enhancement of demulsifying efficiency by optimizing the cultivation conditions[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2014, 21(17): 10386-10398
- [26] Huang XF, Li MX, Lu LJ, et al. Relationship of cell-wall bound fatty acids and the demulsification efficiency of demulsifying bacteria *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 cultured with vegetable oils[J]. Bioresource Technology, 2012, 104: 530-536
- [27] Liu J, Peng KM, Huang XF, et al. Application of waste frying oils in the biosynthesis of biodemulsifier by a demulsifying strain *Alcaligenes* sp. S-XJ-1[J]. Journal of Environmental Sciences, 2011, 23(6): 1020-1026
- [28] Huang XF, Shang JJ, Lu LJ, et al. Influence of pH on emulsion breaking performance of a demulsifying strain *Alcaligenes* sp. S-XJ-1[J]. Microbiology China, 2010, 37(11): 1575-1580 (in Chinese)
黄翔峰, 尚家佳, 陆丽君, 等. pH 对破乳菌 *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 破乳性能的影响[J]. 微生物学通报, 2010, 37(11): 1575-1580
- [29] Peng W, Zhou H, Chen YL. Green biological demulsification technology principle and research status[J]. Xinjiang Petroleum Science & Technology, 2007, 17(2): 67-69 (in Chinese)
彭伟, 周华, 陈永立. 绿色生物破乳技术原理及研究状况[J]. 新疆石油科技, 2007, 17(2): 67-69
- [30] Xu Y. Analysis on effective de-emulsification components produced by a strain and optimization of its intensified culture condition[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Harbin Institute of Technology, 2010 (in Chinese)
徐暘. 一株破乳菌破乳有效成分分析及其强化培养条件优化[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2010
- [31] Hou N, Li DP, Ma F, et al. Effective biodemulsifier components secreted by *Bacillus mojavensis* XH-1 and analysis of the demulsification process[J]. Biodegradation, 2014, 25(4): 529-541
- [32] Wen Y, Cheng H, Lu LJ, et al. Analysis of biological demulsification process of water-in-oil emulsion by *Alcaligenes* sp. S-XJ-1[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(21): 8315-8322
- [33] Liu J, Zhao YP, Hu B, et al. Stabilization mechanism of water-in-oil emulsions and progress of demulsification technology of heavy oil[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2013, 32(4): 891-897 (in Chinese)
刘娟, 赵亚溥, 胡斌, 等. 油水乳状液的稳定机理及其化学破乳技术的研究进展[J]. 化工进展, 2013, 32(4): 891-897
- [34] Rühls PA, Böcker L, Inglis RF, et al. Studying bacterial hydrophobicity and biofilm formation at liquid-liquid interfaces through interfacial rheology and pendant drop tensiometry[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014, 117: 174-184
- [35] Feng ZQ, Yang YJ, Zhu CJ, et al. Crude oil demulsification and pilot testing with biodemulsifier[J]. Journal of the University of Petroleum, China (Natural Science Edition), 2004, 28(3): 93-95, 99, 143 (in Chinese)
冯志强, 杨永军, 朱成君, 等. 原油生物破乳剂的研究与应用[J]. 石油大学学报: 自然科学版, 2004, 28(3): 93-95, 99, 143
- [36] Huang XF, Wang CL, Yang S, et al. Influence of ultrasonic treatment on emulsion breaking performance of a demulsifying strain *Alcaligenes* sp. S-XJ-1[J]. Applied Chemical Industry, 2013, 42(4): 591-595 (in Chinese)
黄翔峰, 王彩林, 杨硕, 等. 超声波处理对生物破乳菌 *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 破乳性能影响研究[J]. 应用化工, 2013, 42(4): 591-595

- [37] Wei LX, Ren L, Xiao YY, et al. Application of biodemulsifier HRB-4 at Chunliang oil production factory in shengli[J]. Oilfield Chemistry, 2004, 21(1): 42-44,60 (in Chinese)
韦良霞, 任丽, 肖英玉, 等. HRB-4型生物破乳剂在纯梁采油厂的应用[J]. 油田化学, 2004, 21(1): 42-44,60
- [38] Li WY. Effect of particles on the stability of the crude oil emulsions[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China University of Science, 2011 (in Chinese)
李文艳. 固体颗粒对原油乳状液稳定性影响的研究[D]. 上海: 华东理工大学硕士学位论文, 2011
- [39] Fernandes RdCR, Borges AC, Tótola MR. Dismistifying the involvement of cell surface hydrophobicity and biosurfactant production in W/O demulsification activity of bacteria[J]. New Biotechnology, 2012, 29: S78
- [40] Ly MH, Naïtali-Bouchez M, Meylheuc T, et al. Importance of bacterial surface properties to control the stability of emulsions[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 112(1): 26-34
- [41] Ly MH, Aguedo M, Goudot S, et al. Interactions between bacterial surfaces and milk proteins, impact on food emulsions stability[J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22(5): 742-751
- [42] Chen W, Zhang J, Tan GR, et al. Study on the influencing factor of Zeta potential and treating conditions for polymer-flooded oily waste water[J]. Offshore Oil, 2013, 33(3): 50-53,64 (in Chinese)
陈武, 张健, 檀国荣, 等. 聚合物驱含油废水 Zeta 电位影响因素及其处理条件研究[J]. 海洋石油, 2013, 33(3): 50-53,64
- [43] Wang W, Feng DC. Influencing factors of Zeta potential value of emulsified oil wastewater[J]. Industrial Water & Wastewater, 2010, 41(6): 55-57 (in Chinese)
王伟, 封顶成. 乳化油废水 Zeta 电位值的影响因素研究[J]. 工业用水与废水, 2010, 41(6): 55-57
- [44] Xu MJ, Li MY, Peng B, et al. Effects of strength of interfacial film and Zeta potential on oil-in-water emulsion stability[J]. Chinese Journal of Applied Chemistry, 2007, 24(6): 623-627 (in Chinese)
徐明进, 李明远, 彭勃, 等. Zeta 电位和界面膜强度对水包油乳状液稳定性影响[J]. 应用化学, 2007, 24(6): 623-627
- [45] Gong FZ. To study the Zeta potential on oil/water interface by Microelectro Phoresis Method[J]. Journal of Guangxi University (Natural Science Edition), 1997, 22(3): 28-31 (in Chinese)
龚福忠. 乳状液膜体系油/水界面的 Zeta 电位研究[J]. 广西大学学报: 自然科学版, 1997, 22(3): 28-31
- [46] Guo YM, Li MY, He HZ, et al. The effects of polymer and surfactants on the interfacial Zeta potential between model crude oil and water[J]. Oilfield Chemistry, 2009, 26(4): 415-418 (in Chinese)
郭亚梅, 李明远, 贺辉宗, 等. 聚合物-表面活性剂对原油模拟油/水界面 zeta 电位的影响[J]. 油田化学, 2009, 26(4): 415-418
- [47] Huang XF, Peng KM, Feng Y, et al. Separation and characterization of effective demulsifying substances from surface of *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 and its application in water-in-kerosene emulsion[J]. Bioresource Technology, 2013, 139: 257-264
- [48] Long XW, Zhang GL, Shen C, et al. Application of rhamnolipid as a novel biodemulsifier for destabilizing waste crude oil[J]. Bioresource Technology, 2013, 131: 1-5
- [49] Huang XF, Peng KM, Lu LJ, et al. Separation and purification of *Alcaligenes* biodemulsifier by dichloromethane-water extraction and silica gel column chromatograph[J]. Applied Mechanics and Materials, 2012, 108: 152-158
- [50] Huang XF, Peng KM, Lu LJ, et al. Carbon source dependence of cell surface composition and demulsifying capability of *Alcaligenes* sp. S-XJ-1[J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(5): 3056-3064
- [51] Vaz M, Meirinhos-Soares L, Sousa CCS, et al. Serotype discrimination of encapsulated *Streptococcus pneumoniae* strains by Fourier-transform infrared spectroscopy and chemometrics[J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 93(2): 102-107
- [52] van der Mei HC, de Vries J, Busscher HJ. X-ray photoelectron spectroscopy for the study of microbial cell surfaces[J]. Surface Science Reports, 2000, 39(1): 1-24
- [53] Ramstedt M, Nakao R, Wai SN, et al. Monitoring surface chemical changes in the bacterial cell wall multivariate analysis of cryo-X-ray photoelectron spectroscopy data[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(14): 12389-12396
- [54] Cox JS, Smith DS, Warren LA, et al. Characterizing heterogeneous bacterial surface functional groups using discrete affinity spectra for proton binding[J]. Environmental Science & Technology, 1999, 33(24): 4514-4521
- [55] Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, et al. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry[J]. Nature Biotechnology, 1996, 14(11): 1584-1586